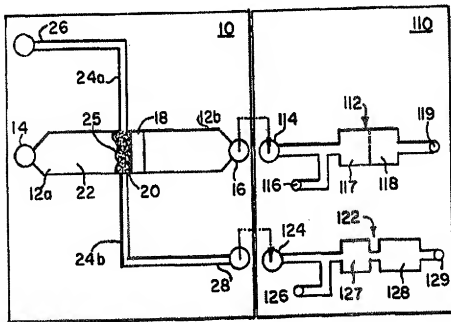




INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁶ : B01L 3/00, G01N 1/28, B01D 35/00	A1	(11) International Publication Number: WO 96/14934 (43) International Publication Date: 23 May 1996 (23.05.96)
(21) International Application Number: PCT/US95/14825 (22) International Filing Date: 13 November 1995 (13.11.95) (30) Priority Data: 08/338,369 14 November 1994 (14.11.94) US 08/338,380 14 November 1994 (14.11.94) US 08/338,728 14 November 1994 (14.11.94) US (71) Applicant: TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA [US/US]; Suite 300, 3700 Market Street, Philadelphia, PA 19104 (US). (72) Inventors: WILDING, Peter; 208 Darby Road, Paoli, PA 19301 (US). KRICKA, Larry, J.; 886 Nathan Hale Road, Berwyn, PA 19312 (US). (74) Agents: HAGAN, Patrick, J. et al.; Dann, Dorfman, Herrell and Skillman, Suite 720, 1601 Market Street, Philadelphia, PA 19103-2307 (US).	(81) Designated States: AU, CA, CN, JP, MX, RU, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Published <i>With international search report. Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.</i>	

(54) Title: MESOSCALE SAMPLE PREPARATION DEVICE AND SYSTEMS FOR DETERMINATION AND PROCESSING OF ANALYTES



(57) Abstract

A mesoscale sample preparation device capable of providing microvolume test samples, separated into a cell-enriched fraction and a fraction of reduced cell content, for performing various analyses, such as binding assays, determinations involving polynucleotide amplification and the like. Analytical systems including such devices are also disclosed.

あって、上記取付け基部が、上記装置のサンプル入口部と内部接続された試験サンプル入口部、及び上記流通通路に沿って試験サンプルを移動させる推進機構を含む組合せ装置。

8. 上記取付け基部がさらに上記試験サンプルの貯留器を含む請求項7記載の組合せ装置。

9. 上記取付け基部がさらに上記流通チャネルの上記入口部分と内部接続された搬送流体入口部と、搬送流体を上記流通チャネルに沿って移動させる推進機構とを含む請求項7記載の組合せ装置。

10. 上記取付け基部がさらに上記搬送流体の貯留器を含む請求項9記載の組合せ装置。

11. 流体サンプル内の分析対象物を決定するシステムであって、上記システムが請求項1記載のサンプル前処理装置と分析対象物の検出装置とを含み、分析対象物の検出装置が：

サンプル入口部；及び流通システム；上記サンプル前処理装置の流通通路の出口部；を決定するように構成された剛性基体を含む、上記流通システムが；

上記入口部と流体伝達関係にある分析対象物の検出領域で、上記分析対象物と反応して上記分析対象物を検出する検出可能な生成物を生成する試薬を有する上記領域と、上記生成物を検出する検出器とを含む；

上記生成物の検出器の出口部が上記分析対象物の検出装置の上記サンプル入口部と流体伝達関係にある、分析対象物の決定システム。

12. 上記分析対象物の検出装置において、サンプル流通チャネルが上記入口部及び上記分析対象物の検出領域と内部接続され、上記分析対象物の検出領域及び上記サンプル流通チャネルの少なくとも1つが少なくとも1つのメモリ層寸法を有する請求項11記載の分析対象物の決定システム。

13. 上記結果が特に上記分析対象物に結合する結合物質である請求項11記載の分析対象物の決定システム。

14. 上記分析対象物が抗原であり、上記結合物質が抗体である請求項13記

載の分析対象物の決定システム。

15. 上記分析対象物が電位子であり、上記結合物質が受容体である請求項1記載の分析対象物の決定システム。

16. 上記分析対象物が所定濃度の標識分子であり、上記結合物質が上記分析対象物の連鎖に対して相補的又は同一源の連鎖を有する標識分子である請求項1記載の分析対象物の決定システム。

17. 細胞由来の所定のポリヌクレオチドの分析を実行する装置をさらに含む、上記分析がポリヌクレオチド増幅反応からなり、上記ポリヌクレオチド増幅装置が：

サンプル入口部；及び流通システム；を決定するように構成された剛性基体を含む、上記流通システムが；

ポリヌクレオチドを増幅する試薬を含む、上記入口部と流体伝達関係にあるポリヌクレオチド増幅領域、上記サンプル前処理装置の流通チャネルの送り出し部分と上記領域とを循環する上記ポリヌクレオチド増幅領域とを介する循環手段、上記ポリヌクレオチド増幅装置のサンプル入口部と流体伝達関係にある上記サンプル前処理装置の流通チャネルの送り出し部から構成される、請求項11記載の分析対象物の決定システム。

18. 上記装置の入口部及び上記ポリヌクレオチド増幅領域と内部接続された、上記ポリヌクレオチド増幅装置内のサンプル流通チャネルをさらに含む、上記ポリヌクレオチド増幅領域及びこれに接続されたサンプル流通チャネルの少なくとも1つが少なくとも1つのメモリ層寸法を有する請求項17記載の分析対象物の決定システム。

19. 請求項11のシステムと上記システムと共に使用される取付け基部と上記組合せシステムであって、上記取付け基部が上記システムのホルダー、上記サンプル前処理装置のサンプル入口部と内部接続された試験サンプルの入口部、及び試験サンプルを上記コンダクター前処理装置の流通通路に沿って移動させる推進機構をさらに含む組合せシステム。

20. 上記取付け基部がさらに上記試験サンプルの貯留器を含む請求項19の

組合セシステム。

2.1. 請求項1.7のシステムと上記システムとを共に使用される取付け基座との組合セシステムであって、上記取付け基座が上記システムのホルダ、上記サンプリング前処理装置のサンプリング入口部と内部接続された試験サンプリングの入口、上記サンプリング前処理装置の流通チャネルの上記試験サンプリングを移動させる推進機構、上記サンプリング前処理装置の流通通路に沿って上記試験サンプリングを移動させる推進機構、上記サンプリング前処理装置の流通チャネルの上記入口部と内部接続された搬送流体の入口部、及び上記流通チャネルに沿って上記搬送流体を移動させる推進機構、を含む組合セシステム。

2.2. 上記取付け基座がさらに上記搬送流体の制御部を含む請求項2.1記載の組合セシステム。

2.3. 上記取付け基座がさらに上記分析対象物取出装置又は上記ボリヌクレオチド分析装置内の上記試験サンプリングのパラメータを検出する検出部を含む請求項2.1記載の組合セシステム。

2.4. 検出部からの所定のボリヌクレオチドの分析を要するシステムであって、上記分析がボリヌクレオチド増幅反応からなり、上記システムが請求項1記載のサンプリング前処理装置及びボリヌクレオチド増幅を実行する装置から構成され、上記ボリヌクレオチド増幅を実行する装置が：

サンプリング入口部；及び流通システム；を決定するように構成された剛性基体を含み、上記流通システムが：

ボリヌクレオチド増幅を含む、上記入口部と流体伝達関係にあるボリヌクレオチド増幅装置、上記サンプリング流通チャネルと少なくとも1つのメソサイズを有するボリヌクレオチド増幅装置と上記増幅を制御するための上記反応領域内の制御手段との少なくとも1つ、上記ボリヌクレオチド増幅装置のサンプリング入口部と流体伝達関係にある上記サンプリング前処理装置の流通チャネルの送り出し部、を含む分析システム。

2.5. 上記ボリヌクレオチド増幅装置において、上記サンプリング流通チャネルが上記入口部と上記ボリヌクレオチド増幅装置とを内部接続し、上記ボリヌクレオチド増幅装置及びこれに接続されたサンプリング流通チャネルの少なくとも1つが少

なくとも1つのメソサイズを有する請求項2.4記載の分析システム。

2.6. 検出部を含む試験サンプリング内の分析対象物を決定するためのシステムであって、上記システムがサンプリング前処理装置と分析対象物の検出装置とからなり、上記サンプリング前処理装置が流体伝達関係にあるサンプリング入口部及び出口部と、上記入口部と出口部との間に配置されるセパレータとを含むサンプリング流通通路を有し、上記セパレータが上記検出部成分が収集される上記流通通路内のセパレータ領域と決定する上記検出部成分を有し、上記分析対象物の検出装置が：

サンプリング入口部；及び流通システム；上記サンプリング前処理装置の流通通路の出口部；を決定するように構成された剛性基体を含み、上記流通システムが：

上記入口部と流体伝達関係にある分析対象物の検出領域で、上記分析対象物と反応して上記分析対象物を検出する検出可能な生成物を生成する装置を有する上記領域と、上記生成物を検出する検出器とを含む；

上記サンプリング前処理装置の流通通路の出口部が上記分析対象物の検出装置の上記サンプリング入口部と流体伝達関係にあり、上記流通通路及び上記領域の少なくとも1つが少なくとも1つのメソサイズを有する、

分析対象物の測定システム。

2.7. 上記サンプリング前処理装置において、上記サンプリング前処理装置と流体伝達関係にあり、収集された検出部成分を上記流通通路から送り出す流通チャネルのさらに含み、上記チャネルが流体伝達を上記分析領域内につづけてセパレータの上記分析部分と組み立てる案内する入口部分、及び上記検出部成分を上記セパレータの上記分析部分と組み立てる上記分析領域外方に案内する送り出し部分を有する請求項2.6記載の分析対象物の測定システム。

2.8. 上記流通チャネルの少なくとも1つが少なくとも1つのメソサイズを有する請求項2.7記載の分析対象物の測定システム。

2.9. サンプリング入口部、及び流通システムを決定するように構成された剛性基体を含み、上記流通システムが上記入口部と分析対象物の検出領域との間を接続する流通通路を含み、上記流通通路及び上記セパレータ領域の少なくとも1つが少なくとも1つのメソサイズを有する、流体サンプリング内の分析対象物を決定する装置

において、

フィルターが上記抽出領域の上置膜の上記流通路内に配置され、上記分析対象物の測定の前記不溶性物質を上記サンプルから除去するようにしている分析対象物の測定装置。

30. 不溶性成分を収集する排水配管がさらに上記フィルターに接続して配置されている請求項29記載の分析対象物の測定装置。

31. 細胞を含有するサンプル液体内の目標とする細胞の前記集団を分離する方法であって：

a) 上記目標集団を特異付ける標識物が結合された細胞膜を有するメンブレンのサンプル集合膜が配置される、画いて決定する細胞部分を有するメンブレンのサンプル液体流通通路を設ける；

b) 可逆的な細胞膜透過物質一面透過物質の結合によって細胞目標細胞集団の成分を細胞することを許容する一方、他の細胞が通過することを許容する条件下で、上記画くに細胞を有するサンプル液体を通過させる；

c) 上記細胞の目標細胞集団をリリースさせるように上記画く内の環境を制御する；

工程を含む方法。

【説明の詳細な説明】

分析対象物の測定及び処理のためのメンブレンの試料前処理装置及びシステム参考関連出願

この出願は次の係属中の特許出願の一部継続の出願である：1992年5月1日付け米国特許出願第07/877,702号；米国特許第5,304,487号である米国特許出願第07/877,563号の分割出願である、1994年2月14日付け米国特許出願第08/196,021号；現在放棄された、米国特許出願第07/877,702号の継続出願である1994年5月26日付け米国特許出願第08/250,100号；現在放棄された、米国特許出願第07/877,692号の継続出願である1994年9月19日付け米国特許出願第08/308,199号。上述の特許及び特許出願に開示全体が本明細書において参照に用いられる。

発明の背景

この発明は、小さな寸法を有し、金等の廉価な試料サンプルの効率的な前処理を促進し、試料サンプルに存在する分析対象物質を特定し及び/又は処理するサンプル前処理装置に関する。また、本件発明は、例えばポリメラーゼ連鎖反応(PCR)等の予め選択されたポリヌクレオチドの増幅を含む種々の検定プロトコルを分析と同時に実行するようにデザインされた類似の寸法の装置と、上述の装置とを含む試験システムに関する。

この10年期において、技術的には種々の原因分析や監視の目的で、生物学的サンプルの分析を実行する多数のプロトコル、試験用具及び装置が開発されてきた。免疫学的検査法、免疫定量検査法、凝集反応検査法、ポリヌクレオチド増幅、種々の配位子-受容体の内部反応及び複合サンプルにおける種の偏差移動を含む分析法の全てが、種々の生物学的な高分子又は汚染物質の存在や量、特定の形質の細胞の存在を測定するために使用されてきた。

最近、生物学的サンプルを採取し、及び特定の臨床学的試験を行うための小型

で使い捨ての装置が開発された。通常はこれによってシリコンエポキシ上に形成された小型の血液ガス分析機の使用が報告されている。庄司、等、サンセンサー、アン

ド・アクチュエータ, 15号: 101-107 (1988)。佐藤らによって微細線シリンコン装置を使用する細胞融合技術が報告されている。佐藤, 等., サンダー・アンド・アクチュエータ, A21-A23号: 948-953 (1990)。チバ・コーポレーション・ダイアグノスティクス社 (米国) によって血液凝固を検出する, マイクロプロセッサ制御のレーザー光度計が製造された。

微細加工技術は微細電子分野において開発されたものである。アンジェル, 等., サンエントペイク・アメリカン, 248号: 44-55 (1983)。微細加工技術は10ミクロン (生物学的細胞の寸法) からナノメートル (いくつかの生物学的な高分子の寸法) までの範囲の、微細な寸法の構造的要素を有する微細工学的装置の製造を可能とした。例えば臨界的な流動特性及び運動特性等、微細工学の研究には上述の小さな構造的要素を有するデータを報告する多くの実験が含まれている。生命科学においては上述の装置の潜在的な能力は十分に活用されていない。

ブルネツテ (Exper. Cell Res., 167号: 203-217 (1986)) 及び164号, 11-26 (1986)) によってシリコン、チタニウム、エポキシ樹脂、及びその腐食物の膜内における繊維芽細胞及び上皮細胞の運動が研究された。マツカートニール (Cancer Res., 41号: 3046-3051 (1981)) によって膜付セアラステラステラ基化における運動細胞の挙動が実験された。ラセル (Blood Cells, 12号: 179-189 (1986)) によって微細網における見直しを得るべく、微細毛細管内における白血球及び赤血球の流れが研究された。フング及びワイズマンによって微細網膜における液体力学の研究が報告されているが、分析装置と関連したデータを得るものではなかった。フング, 等., Med and Biol Engineering, 9号: 237-245 (1971)。ワイズマン, 等., Am Inst. Chem. Eng. J., 17号: 25-30 (1971)。コロンブス等によって多チャネルの実験的実験装置においてイオン選択電極を分離するために、生物学的流体の毛細管流を制御する場合において直交する方向のV字状溝

を圧印し、かつ傾斜した2枚のシートが利用された。コロンブス, 等., Clin. Chem., 33号: 1531-1537 (1987)。増田ら及び警津らによって細胞の

取扱い操作 (例えば、細胞融合) のために流注電圧チャンネルの利用が報告された。増田, 等., IEEE/IAS会議要旨, 頁1549-1553 (1987)。實津, 等., IEEE/IAS会議要旨, 頁1735-1740 (1988)。この技術は流注電圧チャンネル、特に生物学的分析における分析対象物質の測定のための微細工学的装置の潜在的な使用については十分に検討されなかった。

ポリスチレンナノ増幅器を用いた生物学的分析はよく知られている (例えば、マニスチス, 等., モレキュラー・クロマトグラフィ: 実験マニュアル, コール・スプリング・ハーパー・ラボラトリ出版社, 1989, 頁14, 1-14, 35参照)。そのような技術の一つがPCR増幅であり、これは熱安定ポリヌクレオチド増幅 (DNAポリメラーゼ (タン, 等., J. Bacteriol., 127号: 1550 (1986))、ヌクレオチド三リン酸塩、及び異なる遊離度で、テンプレートDNAの両端の相対濃度上に存在する遊離に対して相対的な遊離を有する2つのオリゴヌクレオチドを用いて、DNAテンプレート上で実行されることができ、これは増幅されるべきDNA断片 (プライマー) の濃度に位置する。反応成分は二重螺旋構造のテンプレートDNAの交差を外すためのより高い温度 (例えば94°C) と、これに続くアニール及び重合のためのより低い温度 (例えば65°C) との間で繰り返される。塩交換の温度と、アニール及び重合の温度との間で繰り返される温度反応によってテンプレートDNAのほぼ指数関数的な増幅が得られる。温度増幅を用いて動的にPCR連鎖反応を実行する装置は市販されている (パーネン・エルマ社)。

PCR増幅は遺伝的疾患の診断 (エンゲル, 等., Proc. Natl. Acad. Sci., 85号: 544 (1988))、臨床的サンプリングにおける病原性微生物の検出・分離 (オウ, 等., サイエンス, 239号: 295 (1988))、法廷証拠、例えば精液の遺伝的特定 (ジー, 等., サイエンス, 335号: 414 (1988))、活性化された細胞形成能力 (フエア, 等., Proc. Natl. Acad. Sci., 85号: 1629 (1988)) 及びコロニー分子の増殖 (オステ, バイオテ

ニックス, 6号: 162 (1988)) における突然変異の分析に利用されている

略号08/038、199号の対象であるメソ堤原ポリスクリンオリチン樹脂装置に
関連して使用されるのに面する。702号及び199号の出版の明示全体は
後記される場合には十分に、本件出版で参照されるこ
とによって利用される。

[illegible][illegible][illegible][illegible]

ここに説明した各分拆装置は本件発明のサンプル前処理装置と共に使用されるか否かに関係なく、本件発明の範囲に含まれる。

上述の装置に流路は装置のホルダーとして機能する取付け基部とともに使用され、取付け基部は装置上の１又は複数の開口部を取付け基部内の１又は複数の流通ラインに一貫させるようになる。分析対象物を含有する全血等の試験サンプルはサンプリング前処理装置の入口にセットされた後、取付け基部又は装置自体に一体化されることでできる能通機構、例えばポンプが採用され、サンプリングは流通管路に沿って分離膜を越えて流通し得る。被検体成分を含まないサンプルは前者の出口部が後者の入口部に対して流体伝達状態にある、サンプリング前処理装置から分析対象物後の装置に向けて搬送される。分離膜及び致密する血液細胞や他の形態された物体等の被検体成分は分離膜から送り出され、ポリヌクレオチド増幅装置の入口部に對して流体伝達状態にある、サンプリング前処理装置の流通チャネルの送り出し部を超えてポリヌクレオチド増幅装置に搬送されることができ、他方、試験サンプルはサンプリング前処理装置に入力されることができ、あるいはこのサンプルは毛管管作用によって入口に設置メソ機構でサンプリング前処理装置内に抽入することができ、選択的に上記の装置内で実行される分析プロトコルに基づき、取付け基部または装置内または装置外に分離された融合物質、ポリヌクレオチド如く糖質、ヘパッ、あるいは望みの分析を実行するために必要な他の試薬等を輸入するように入予インされることである。

本件第Ⅲの装置及びシステムは顯微鏡や分子の分析や生物を含む種々の臨床学的試験を自動的に、高感度に、しかも迅速に実行するために、あるいは又はは組織の生長を制御するために用いられることができる。分子又はイオンの分析や、肺の生長を制御するために用いられることができる。

の装置の実施形態の一部拡大図である；第9C図は分岐領域において流れの制限によつて分析対象物の検出を許容する分岐された流通管路領域を含む他の装置の実施形態の一部拡大図である。

第10A図は本件発明のサンプル前処理装置と共に使用され、微液サンプルに基つて種々の検定プロトコルを実行する他の装置形態の分析装置を示す概略平面図である；

第10B図は第1の流通通路の一部を示す拡大平面図であり、そこを通過してサンプル流体が第10A図に示される装置のサンプル入口部分に導入される；

第10C図は第10B図の10C-10C像に添つた第1の流通通路の一番端断面図であり、第1の流通通路を構成する側方に隣接配列されたV字状チャネルを示す；

第10D図は第10C図の10D-10D像に添つた第1の流通通路の一番端断面図であり、V字状チャネルを分離する複数の特定の構造的特徴を示す；

第11A図は本件発明のサンプル前処理装置と共に使用することを意図した分析装置の概略平面図であり、分析装置は細胞の分選、細胞の分離及びPCR等のポリスクリオナド増幅を含む種々の手順を実行するのに適した一連のメンブレンチャンバーを有する；第11B図はメンブレンPCR分析装置のための他のデザインを示す概略平面図である。

第12A図及び第12B図は本件発明のサンプル前処理装置の流通通路に配置された無縫加工され、流れを制限するセパレータの他の実施形態を示す一断面平面図である。

第12C図及び第12D図は本件発明のサンプル前処理装置の流通通路に配置された無縫加工され、流れを制限するセパレータのさらに他の実施形態を示す長手方向の一部断面図である。

類似の参照符号は類似の部分を示している。

発明の詳細な説明

本件発明のサンプル前処理装置は好ましくは厚み1〜数ミクロン以下、面積は $0.1\text{ cm}^2\sim 0.5\text{ cm}^2$ の範囲の寸法を有するチップ形状を有する剛性基板

を含む。この基板には微細加工にてサンプル流通通路が形成され、サンプル流通通路は入口及び出口及び入口と出口の間の間に配置されたセパレータを有している。セパレータの上流対面部分は流通通路内に分離領域を形成し、分離領域内では試験サンプルの微粒子成分が収集される。また、この装置は分離領域と流体伝導領域にある流通チャネルを含み、これらは収集された微粒子成分を分離領域から送り出すように機能する。この流通チャネルは入口部分及び送り出し部分を有し、入口部分は検出流体を分離領域内に、及びセパレータの上流対面部分を越えて案内し、送り出し部分は微粒子成分が浮遊している検出流体を分離領域の外方に案内するようにになっている。上流の流通通路及び流通チャネル部分の少なくとも1つは少なくとも1つのメンブレンの寸法を有する。

サンプルの微粒子成分が分析されるべきでない場合、これらは分離領域に貯存することができ、その場合において流通チャネルは基本的に機能せず、従つて装置から除去されることができる。

ここで、“メンブレン”とは少なくとも1つが $0.1\text{ }\mu\text{ m}\sim 1000\text{ }\mu\text{ m}$ 、より好ましくは $0.2\text{ }\mu\text{ m}\sim 500\text{ }\mu\text{ m}$ の範囲の断面寸法を少なくとも1つ有する、流通通路又は流通チャネル及び、反応及び/又は検出チャンパー等の他の構造的要素を表す。この流通通路及びチャンパーの好ましい深さは $0.1\text{ }\mu\text{ m}\sim 100\text{ }\mu\text{ m}$ 、より好ましくは $2\text{ }\mu\text{ m}\sim 50\text{ }\mu\text{ m}$ の範囲である。流通通路の好ましい幅は $2\text{ }\mu\text{ m}\sim 200\text{ }\mu\text{ m}$ 、より好ましくは $3\text{ }\mu\text{ m}\sim 100\text{ }\mu\text{ m}$ の範囲である。チャンパーの好ましい幅は $0.05\text{ mm}\sim 5\text{ mm}$ 、より好ましくは $50\text{ }\mu\text{ m}\sim 500\text{ }\mu\text{ m}$ の範囲である。セパレータにおける流通通路の幅は典型的には大部分の生物学的サンプル及び他の試験サンプルから微粒子物質を分離するのに十分小さい $50\text{ }\mu\text{ m}$ 以下の範囲である。セパレータの流通特性は通常は約 $0.1\text{ }\mu\text{ m}$ から約 $100\text{ }\mu\text{ m}$ の深さを有する。セパレータの流通通路の長さとは約 $0.1\text{ }\mu\text{ m}$ から約 3 m の範囲内にある。

流通通路及び微粒子の積送部分は断面で見ると三角形、四角形、矩形又は他の形状をなし、与えられた積送を経た又は積送内へのサンプル流体の流れの通路を制限するの少なくとも1つの断面形状寸法は、メンブレンである。

本件発明のメソ組織の表置はここで説明する分析装置とともに、広範な生物学的分析におけるサンプリング前処理を促進させ、双方の試験サンプルにおける最小限の分子的部分材料集積及び細胞的分析対象物の取り込みを迅速に確実なことを可能とする。分析が終了すると、装置は代表的には破壊される。

少なくとも1つのメソ組織寸法を有する少なくとも1つの流通通路又は他の構造要素を備えたメソ組織装置は、当業者にとって公知の種々の微細加工手法を用いて剛性基体材料から大量生産的に設計され組立てられることができる。かかる手法にはスピンコーティングや化学的蒸着等の微細加工技術、例えばUV又はX線プロセス等のレーザ加工又はフォトリソグラフィ技術、歴史的なプロセス又はプラズマプロセスのいずれか一方によって実行されることのできるエンッチング手法、LIGAプロセス又はフラスカチックモールドが含まれる。例えば、マンダンのトレンド・イン・アナリティカル・ケミストリー 10号: 1494~1495 (1991) 参照。

本件発明のサンプリング前処理装置は適切な基体の表面に流通通路及びセパレータを形成した後、その表面上にカバードをマウントすることにより便利に製作されることのできる。剛性基体及び/又はカバードはシリコン、ポリシリコン、シリコンガラス、熱電材料、ガリウム化合物、ポリイミド、シリコン化合物及び二酸化シリコン等の材料によって構成されることのできる。また、カバード及び/又は基体はアクリル、ポリカーボネート、ポリスチレン、ポリエチレンあるいは他の樹脂材料等のプラスチック材料で構成されることができ、選択的には、カバード及び/又は基体は透明材料、例えば比較的に、陽極的に結合されたガラス層あるいは超薄膜層で被覆されたプラスチック材料で構成されることができ、他方は、樹脂の材料の2つの層がサンディッチされることのできる、あるいは適切な基体材料が2つの透明カバード材料の間にサンディッチされることができ、

第1図には本件発明のメソ組織サンプリング前処理装置の1つの実施形態の概略が示されている。この装置10は適切な基体11内に被覆組立てられて、これによりサンプリング入口14及びサンプリング出口部16を有するサンプリング流通通路12a及び12bが形成されている。フィルタ形式のセパレータ18が入口部14と出

口部16との間の流通通路に挿入されている。セパレータの上流対面部分20には試験サンプル中の微粒子成分を収集する分離領域22が形成されている。また、装置は分離領域22と流体伝達関係にある流通チャネル24a及び24bを含む、流通流体を分離領域に分配し、収集された微粒子物質を分離領域から送り出すようになっている。流通チャネル24a、24bは搬送流体、例えば等速流圧バンプアを供給源(図示せず)からセパレータ18の上流対面部分20を越えて案内する入口部分26を有する。送り出し部分28は搬送流体をフィルタ一層の表面を越え、分離領域22の外方に搬送するようになっている。

セパレータ18はサンプリング前処理装置のサンプリング流通通路12a、12b内に被覆組立てられ、分析の前には装置を通過した試験サンプル中の微粒子物質を除去するに役立つようになっている。第2図及び第3図に示される、1つの実施形態において、セパレータは流通通路12a、12bに比して寸法的小さい一連のメソ組織流通部分によって構成されている。操作において、セパレータ18はフィルタとして機能し、微粒子物質をその上流側表面18aに蓄積する一方、流通部分を出た流通物質は流通通路12bに沿って流動するようにになっている。フィルタ一層部分19は約5.0μmないし約5.0cmの範囲の長さ及び幅で被覆組立てられ、この場合に流通通路12a、12bはほぼ100.0μmの程度の最大長さ及び幅大端を有する。フィルタ一層素は流通通路内に配設された基体材料の層を越え立したかなくとも1つの、好ましくは層の突起を形成するように被覆の基体内に被覆部分に設けられ、これは分離領域を増強したサンプリング流体の流れを制御するのに役立つようになっている。

第2図に示されるように、セパレータ18の上流対面部分の外方には突起部Pが設けられ、サンプリング流体中の微粒子物質によって流通部分の閉鎖を阻止するのを促進するようにになっている。また、セパレータ18の上流対面部分に近接して

流通流体(図示せず)が設けられることができ、サンプリング流体から取り除かれた不溶性微粒子を収集するようになっている。

第1図から分かるように、セパレータ18は本格的にはサンプリング入口14と出口部16との間に所定の時間的に配設する静止的構造であるのが好ましい。他方、し

い、形成された生成物は分析対象物の性質又は量としての明確な情報を与える生成物である。この生成物は反応生成物である。あるいは抽出を施す次の反応に当面される形態で抽出されることができ、抽出された反応/抽出物118はこの目的のために取捨されることである。

分析対象物特定の混合物質を含む溶液は反応領域と液体伝達領域にある入口部(図示せず)を介して反応領域117に導入されることができ、水溶液中に導入された蛋白質結合物質は非特異的に結合された形態でメソ規模構造に保持されることができ、他方、結合物質は例えばチャネル表面に、又は可動、剛性相持、例えばチャネル内に配置された剛性又は非剛性のポリマー膜に物理的に固定されることができ。

装置110を用いてポリスクレオチド増幅を実行する場合、サンプル前処理装置110の送り出し部分から送られた対象の細胞が溶媒精又は上述の米田特許第5,394,487号に説明されているような分離装置のいずれかによる分離に支配される。目標のポリスクレオチドは抽出領域127内で増幅を受けた細胞から放出され、増幅されたポリスクレオチドは抽出領域128で抽出されることができ、1又は複数の開口116,119,126及び129がシステムを排気するために大気と開口されることができ、結合構造増幅部112及びポリスクレオチド増幅/検定増幅部122の領域にかかると装置の後述の他の実施形態を参照しつづかに説明されるであろう。

第5図に示されるように、検定増幅部112及びポリスクレオチド増幅/検定増幅部122は単独として共通の基体上に形成されているが、この増幅部は後で明らかになるであろうが別々の基体上に組立てられ、別々の分析装置又はチップとして機能することもできる。

第5図に示されるように、上述のサンプル前処理装置及び分析装置が分析シ

ステムとして機能するように一連に使用される場合、例えばこのシステムは有利なことは第6図、第6図及び第7図に示される形式の取付け基部と組合せられ、上述の第4図の取付け基部と同様に、第6図の取付け基部50は各装置に

流体を分配し、各装置に流体を送り出し、各装置間で流体を搬送するのに役立つようにになっている。取付け基部50はサンプル前処理装置10及び分析装置112を保持し、装置内の流体を取付け基部の流通ラインと一致させる取付箇所を有する。特に、流通ライン54aはサンプル前処理装置の入口部14と一致し、流通ライン54bはサンプル前処理装置の出口16及び入口114と一致し、流通ライン54cは分析装置の検定増幅部112の出口118と一致している。第6図に示されるように、流通ライン54aは取付け基部入口部56と液体伝達領域にある一方、流通ライン54cは取付け基部の出口57と液体伝達領域にある。取付け基部は典型的には分析システムに対してサンプル流体を送る推進機構、例えばポンプ58を含む。微粒子を含む液体試料サンプル、例えば全血、分析対象物を含んでいることが疑われる液体が取付け基部50の入口部56に供給された後、ポンプ58が作動されてセパレータ18に対してサンプルを送り、微粒子成分が実質的に減少されたサンプル流体、例えば精液が提供される。実質的に微粒子生物がなくなったサンプル流体は試験、例えば免疫学的検定のために、流通ライン54bを介して装置10から検定増幅部112に送られる。

分析装置の反応/検出領域内において結合基体に対する分析対象物自体又は分析対象物の反応生成物の結合は上述の参照された関連出願(例えば、米国特許第777,772号参照)に開示されているように、装置内のサンプル流体の圧力又は電気的導電性の監視を含む多くの手法により、あるいは電気的又は機械によって透明カーブを介しての光学的な検出法により検出されることができ、

例えば、第6図に示される分析装置112の反応領域117内の結合物質と分析対象物との反応はメソ規模の流通経路の特定の領域におけるサンプル流体の圧力を監視することにより検出されることができ、これは口部14及び119を介して各々装置に出入りする流体の流通圧力を検出する2つの圧力検出器59a,59bによって第6図の分析システム-取付け基部の組合せ内で実現され

ることができ、検定が行われている間、検定が連続し、又は分子が化学的に相互反応してネットワークを形成し、反応/検出領域を通過するサンプル流体の制限された流通又は能性の増強を招来すると、かかる変化は機械的な結果を示す

リヌシオンオナド導電チャネルの速度はガラスカバー 109 を介して反屈チャネルに指向されるタイムドレーザーバーによって制御され、サンプルの連続加熱が増幅サイクルのために必要な温度まで許容されることができ、シリコンの熱特性は迅速な加熱冷却サイクルを可能とする。

第 4 図、第 6 図、第 6 A 図、第 6 B 図及び第 7 図に示される本件発明の全の実施形態において、ボンディング付け基部内のマイクロプロセッサによって制御されることとができる。また、最後に述べた図に示される装置は場合によって例えば取付け基部上にマウントされたランプ（図示せず）、例えば接着により取付する装置表面の検閲、あるいは取付け基部に対して装置を適切な方法として装置を取付箇所は相対的に保持する、等を含む種々の方法により取付け基部の取付箇所にあるいは相対的に固定して保持することができ、

第 8 A 図には本件発明のサンプル処理装置と組合せて使用されることのできる生物学的検査装置が示されている。装置 130 は基板 131 上に組み立てられ、基板 131 にはチャネルの両端に形成された入口部 133 を備えたメソ規模流通チャネル 132 A、132 B と、中央のメソ規模の混合／捕獲／検出チャネル 135 とが設けられている。第 8 A 図に示されるように、チャネル 135 の断面寸法はチャネル 132 A、132 B のそれに比べて大きくかつている。

分析対象物と特に組合せる物質等の検定試薬はチャネル 135 内の静的又は可動支持体のいずれか一方に固定されることができ、例えば、ポリマー微粒子等の可動支持体を使用された場合、検定する寸法は固定された試薬がチャネル 135 内に閉じ込められるために、流通チャネル 132 A、132 B の断面寸法に比べて大きくなるように選択されるべきである。このように微粒子可動支持体上に固定された試薬は入口部 137 を介して上手くチャネル 135 内に充填されることができ、

ここに述べた形式の装置は種々の免疫学的検定反応を実行するために使用されることができ、例えば、低圧抗原（CEA）の検定のための非特異的免疫学的手段検定法は例えばフラスチックビーズ等の微粒子支持体に固定されたモノクロ

ナル・抗 CEA・抗体でチャネル 135 を充填することにより実行されることが

ができる。CEA のために分析されるべき試験サンプルは次にチャネル 135 を充填するために加えられ、固定された試薬とともに導入された流体を追い出す。その後、チャネル 135 内の内容物は十分な時間保持されて抗原-抗体が十分に結合される。続いて、モノクロナル抗 CEA 抗体、ゴースドアンチペルオキシダーゼ等の抗体検出試薬がチャネル内に加えられ、その内容物が再び保持される。発色性基体の溶液が次にチャネル 135 に加えられ、これは固定された試薬を洗淨し、非結合の共役を洗い出すのに役立つ。十分な基体がチャネル内に結合されて固定試薬と結合して酸化ペルオキシダーゼと反応する。発色の生成速度はサンプル内の CEA 濃度と直線的に比例する。

また、装置 130 には試験サンプル内のチロコキシシンを確定する抗抗的検査を実行するために使用されることができ、このフォーマットを要する場合、チャネル 135 にはフラスチックビーズの表面に結合した抗チロコキシシン抗体からなる固定試薬が充填される。チロコキシンのために分析されるべき試験サンプルはチロコキシシン・ペルオキシダーゼ溶液と予め混合されてチャネル内に加えられ、チャネル内には充填されるときにも固定試薬とともに導入された流体を追い出す。次に、チャネル内の内容物は十分な時間保持されて抗原-抗体が十分に結合する。選択的にはバックフッワーがチャネル 135 を流通させて固定試薬が洗淨される。次に、発色性基体がチャネル内に加えられ、固定試薬が洗淨されるときにも非結合試薬が洗い出される。十分な基体がチャネル内に保持され、固定試薬と結合した酸化ペルオキシダーゼと反応する。発色の生成は試験サンプル内のチロコキシシンの濃度と逆比例する。

第 8 A 図の検査装置部はチャネル 135 内の固定試薬を洗い込むように構成されているが、そのデザインは法律の目的で流体が固定試薬をポンプで注入し通流させることができるものである。

最後に述べた 2 つの実施形態は他の装置が種々の検定フォーマットを実行するのに使用できる 2 つの例として、第 8 A 図の装置として単に例示されたものであることを利するべきである。

第 8 B 図には基板 141 上に微細加工され、例えば免疫学的検査によって分析

対象物を捕獲するためにチャネル145と流体伝導管路にある入口部143を有する分析装置140が示されている。この装置は酵素免疫学的測定を実行するために適用され、その目的のため、装置は独立したチャネル147を有し、これに適用した基体上の酵素酵素の反応によって生成される発色反応を捕獲し、蓄積させるための捕合剤を内蔵している。例えば、蛋白質分析対象物が「サンドイッチ」検定技術を用いて検定されることで、その場合に分析対象物はチャネル内に固定されて特定の分析対象物と捕合する状態でチャネル145内に捕獲される。捕獲された分析対象物は例えばアルカリ性ホスファターゼからなる酵素阻害剤と、該阻害剤と特異的に結合する抗体とで識別される。フルオロセイン誘導体は捕獲基質のための発色性基体としてチャネル145内に導入される。アリカリ性ホスファターゼが基体上に作用してチャネル147内に固定されたフルオロセイン阻害剤によって捕獲されるフルオロセインが生成される。

チャネル147内には例えば構造調整剤に固着された材料によって水性環境が形成されると、捕獲剤又は反応混合成分、例えば陽活性剤又は陽電荷子形成剤が結合フルオロセインからの蛍光信号を改善するであろう。発色剤の抽出はチャネル147内で実行され、あるいは発色剤が他の装置において抽出されるため、出口部149を介して装置から取り除かれることができる。この測定を実行する場合に4-ニトロフェニール置換剤又は4-メチルベンゾフェニール置換剤等の他の基体は脱炭酸に生物物を捕獲するために使用される捕合剤とともに選択される可能性がある。

第9図には本件発明を実施する場合に使用されることのできる生物学的測定装置の他の実施形態が示されている。装置150の基体151には入口部152a～152e、流通チャネル154a～154g、反応チャネル156a、156b及び検出器/抽出チャネル158が配置組立てられている。反応チャネル156a、156bは各々、屈曲メゾ屈曲チャネルを含む。屈曲チャネルの通路長さはサンプリングの混合及び添加のタイミングが一致するようにデザインされることである。この形状の装置は装置内の入口と一致される出口を有する取付け

基部と組合せて利用されることができ、その取付け基部は装置の流通システムが

らの流体を分配し受け取ることで、選択的にはチャネル158内の積層的又は又は量的結果を光学的に検出することができ、装置の1つの用途においては、サンプリングのコンテストが確定されることができ、コンテストは、コンテストが入口部152aを介して供給され、バックアップ及びサンプリングが入口部152b、152cを介して与え加えられる。次に、混合物はチャネル154dを経て屈曲した混合/反応チャネル156aに送られる。混合及び反応の時間は、屈曲チャネルを適切な長さで制御加工し、流速を制御することにより予め決定されることができ、コンテストバックアップが入口部152dを介して加えられる。

チャネル154eを経て屈曲チャネル156bに送られる、そこでコンテストバックアップが入口部156a内の流体との間のタイミングのより混合及び反応が起こる。上述と同様の加熱手段が装置を37℃又はそれ以上に保持するために設けられることができる。発色性基体が抽出のために流通チャネル(図示せず)を介して153eに導入される。簡易的又はは急性的結果が例えばチャネル上に配置された光学的要因を介して検出チャネル158を覆覆することにより光学的に抽出されることができ、検出チャネル158には酵素反応の生成物を捕獲し、従って抽出を促進させる能力のある固定結合剤が設けられることができる。この装置は臨床化学的酵素反応又は他の反応の範囲に適用されること

第9図Bに示されるたの装置形態によれば、識別された量及び分析対象物の相対は分析対象物及びリソース可能な結合する特定の結合剤とを含むチャネル158a内で起こる。リソースされた識別剤は量及び分析対象物はチャネル158b内で抽出のために捕獲される。

第9図Cに示されるたの装置形態において、流通チャネル154fは流通通路がチャネル154eに比してより小さい断面を有し、これにより流速を調整する。流通通路の流れる速度が制御されるように調整されることができ、第9図に示されるように、チャネル154fは各分岐チャネルで小さな分岐を有し、結果的に強い流通通路を与える非均質断面のバックアップで構成されている。この装置

は、様々な装置の適用に使用されることができ、微粒子誘導装置又は液体合

成物等導電集の現象が流通チャネル154fの接続部分159を通過するサンプルの相関に基いて検出される。

第10A図は種々の結合検定プロトコルを実行するためにデザインされたメモリ回路分析装置170を概略的に示す。この装置は複数のサンプルと測定された少量の試薬とに基づいて分析対象物の量を決定することができ、装置内には検出されるべきと識別された生成物が生成され、その検出全体のサンプル、未反応試薬及び反応生成物が装置内に閉じ込められて保存し、その後に廃棄されるようになっている。

この装置は第6A図を参照して説明された一般的な形式の取付け基部（図示せず）と組合せて使用されることができ、かかる装置は装置を保持する取寄匣所有することにも、流通ライン、及びサンプル、試薬、洗淨溶液およびその類似物を装置に分配するためには共同するポンプ及びバルブを有する。また、取付け基部には全てここで説明されるように、温度コントローラ及びセンサースtage、分析対象物の検出を促進する圧力センサースtage及び/又は電気コネクタ、光学的検出手段、信号増幅及び計量手段が含まれる。また、この組合せは装置全体のシーケンス及びコントロール要素、計量前駆の指示及び例えば取付け基部のマイクロプロセッサを介して又は外部コンピュータと接続されることによって制御する手段を含む。

この装置は上述のように0.01~100 μ Lの範囲、好ましくは約0.5 μ Lから約50 μ Lまでの全容積を有するように構成される流通管路が横断加工されている。

使用に際しては複数の試験サンプル流体が入り口171に導入される。この試験サンプル流体は例えば入り口171に導入される前に、本件発明のサンプル前処理装置に通過させることにより予め流通されることができ、他方、このサンプル流体は装置170内に導入された後に流通されることができ、内部流通は横断流通技術によって検出されることができ、第10Bに示されるように、入り口171に導入された流体はサンプル流体が最初に通過する流通管路172は、2つの隣接するV字状チャネル172a、172bに分割され、長

手方向の隔壁173によって分離され、これは基体材料で形成されるのが好ましい（しかし、カバープレート又はシートの一部とされ、そこから吊り下げられるであろう）。隔壁173は装置のカバーとともに、第10C図に示されるように、少なくとも1つの流通管路部分を形成し、これは流体が流通するのを許すが、流体サンプルの微粒子成分、例えば細胞の流通を阻止するのに十分小さい方法である。隔壁173はサンプル流体を流通管路172aには直接的に、流通管路172bには間接的に供給するように配置され、流通管路172b内を通過する流体は入り口171に導入された予め流通されていないサンプルに比して微粒子成分が実質的に減少されている。

流通管路172は入り口171の下流側において比較的小さな断面寸法から比較的大きな断面寸法を分岐するように、あるいは入り口の下流側において比較的大きな断面寸法を分岐する断面寸法とを集合させる断面を備え、又少なくとも1つの流通管路の側面にはほぼ平行に設置される隔壁173を備えて形成されることができ、かかるデザインはサンプル流体に非線形な流れを与え、流通管路部分174から微粒子を取り除くのを促進する。

試験サンプル流体が装置170の外方で流通される場合、上述の内部フィルタは不要とできる。他方、内部設置されたサンプル流体は入り口175を介して直接、従って流通管路172をバイパスして装置内に導入されることができ、また、必要な場合にはバンプが形成されたサンプル流体の前処理のために入り口175を介して導入されることができ、過量のバンプは出口部176に収集されることができ。

流通管路172aに横置された微粒子物質は第10B図に示されるように出口部176に送られる。

流通管路172bの密通物質は次に計量チャネルとして導流するように適切な寸法に設定された流通管路177内に送られ、分析のために所定のサンプル量が集められる。この所定のサンプル量は通常は約1 μ L程度であろう。装置170には分析のために装置内のサンプル流体の所定量を計量するのを促進するため、スケール178が例えばエッチング等で設けられることができる。規定のサ

ンパルを装置170内に導入することを可能とすることにより、流通通路177ではまた分析対象物の計量を許容することとなる。

装置170内に、又ははかかる装置と共に使用するようにデザインされた取付け基座内に組み込まれた適切な流量調節（図示せず）が計量されたサンプル流体を流通通路179に搬送するために採用されることができ、これは連続的にサンプル流体を結合弁を実行する場合に使用されるブライマリー試薬と混合するために設けられる。装置170内にかかる混合チャンセルを含むことは分析対象物とブライマリー試薬との間の迅速で完全な反応を達成する上で有益である。

サンプル流体、試薬、バックアップ及びその類似物を装置170の流通システムに搬送するための適切な推進機構には種々のポンプ、例えば微細機構ポンプ、ダイヤフラムポンプ、シリジジポンプ、容積制御ポンプ、同様に内方流通圧導線、ガスの電気化学的装置による誘導流及び別置者に公知の他のポンプ手段が含まれる。

ブライマリー試薬は入口部180を介して装置内の流通通路179に直接的に分配されることができ、このブライマリー試薬は流通通路179に導入された後、計量されたサンプル流体と連続的に又は基本的には即時に混合されるようになる。通常のブライマリー試薬は出口部181を介して流通システムから送り出されることができ。

ブライマリー試薬の供給源は選択的には装置170内に設けられることのできる内部検出チャンセルとされることができ。他方、ブライマリー試薬は上述の第6A図で説明された取付け基座等、検定装置とともに使用される取付け基座内部の貯蔵部から、あるいは装置外部の他の供給源から装置内に分配されることができ、このブライマリー試薬は乾気又は減圧乾燥の形態、あるいは他の適切な形態で溶液、ゲル又はニードルとして格納されることができ。例えば、ブライマリー試薬は装置170内の場所において連続搬送されることができ、その場合に例えば入口部180を介して導入される試験サンプル流体又は適切な溶媒がブライマリー試薬を溶解するために使用されることができ。他方、試験サンプル流体又は試薬は上述のように流体搬送手段により流通チャネル179から第10

図に示される流通システム外方の貯留チャンセル（図示せず）に案内され、ブライマリー試薬を溶解させることもできる。さらに、加熱手段又は電熱手段（図示せず）が貯留チャンセルに採用されてそこに貯留されたブライマリー試薬の溶解を促進させることもできる。

サンプル流体と溶解されたブライマリー試薬とからなるブライマリー反応混合物は、又、上述のように、乱流を促進させる物理的要素を有する流通チャネル179内で反応させることもできる。攪拌手段又は他の手段がブライマリー反応混合物の十分な混和を確保するために設けられることができる。このブライマリー反応混合物は所定の反応が終了するまでの十分な時間流通チャネル179内に保持されるようになる。

第7図で説明したような、流通チャネル179内の温度を調整する手段が、選択的にはブライマリー反応状態を高めるために利用されることができ、また、流通チャネル179内の温度検出する手段が必要な場合には設けられる。流通通路179内のブライマリー反応混合物の滞留時間と検出された温度とを相互に関連させるようにシステムの全体的機能を制御するマイクロプロセッサ又は類似の装置には温度検出手段が機能し得るよう接続されることができ。反応が完了するところによって検出された混合物の全部又は一部が増えは上述のポンプ又は他の流体源、ブライマリー反応混合物の全部又は一部が増えは上述のポンプ又は他の流体源又は検出される。他方、その存在又は濃度がサンプル流体内の分析対象物の存在又は濃度と相互に関連する、2次反応の生成物が分析対象物の検定に採用されることができ。

これらは結合検定を実行する場合に一般的に用いられる。装置170と関連し利用される検出技術である。簡潔に言えば、これらは他の試験試薬によって実行されるような化学的試験；例えばブライマリー反応の間の化学的变化によって指示される分析対象物の特性における変化、例えば吸光度や波長におけるシフト、フルオレセンス分極の変化、フルオレセンスストークスシフトにおける変化、及びその類似における変化を検出する分光学的使い方；顕微鏡、画像解析又はレ

似の手順によって測定される抵抗、及び反応したフライマリー混合物の電気化学的挙動の測定、例えば電流計及び/又は電位差計/電極電圧計の技術による特定の測定を含む。

分析対象物の測定のための2次反応の実行に関し、流通通路182によって決定される捕獲領域が設けられ、捕獲領域には上述の形式の固体捕獲手段によって反応したフライマリー混合物の全部又は一部が送り込まれ、捕獲領域内ではフライマリー反応混合物中の生成物の1又は複数の成分が表面への結合によって捕獲されることができ、結果的に検出及び/又は計量が行われる。捕獲試薬は流通通路182の壁面上、流通通路182内に存在する液体又はビーズの表面上、あるいは両者の上に固定されることができ。

プラスチック、ラテックス、シリカ又は、電磁誘導を含む適切な支持材料からなり、フライマリー反応混合の生成物に特に結合する能力のある固相捕獲要素を流通通路182に予め充填するたために、入口部又は出口式が設けられている。

微細な捕獲要素は具体的に乾燥又は溶剤乾燥される多孔スラリー、又は乾燥のいずれかの形態で流通通路182に注入されることができ、いずれの場合に流通通路への充填は通常的には乾燥手段又は他の手段によって補助されることができ、捕獲要素の可動基底は10ナノメートルから10ミクロンまでの寸法を有する繊維状又はビーズからなり、ビオジェン化され又は昇役抗体が特に結合するアビジン、ストレプトアビジン又は他の基体の表面コーティングがなされている。

流通通路182には液体を制限する構造的要素189a、189b又は他の手段が設けられて流通通路182内に捕獲要素を閉じ込める一方、液体の通過を許容している。また、微細な捕獲要素は第8A型について説明されたように流通通路182内に閉じ込められることができる。

フライマリー反応混合物は捕獲要素との反応が公知の程度まで進行する、好ましくは本格的に終了するに十分な時間たつて流通通路182内に残留されるようになる。流通通路179に即して上記で説明したように、流通通路182内の量を覚えて、検出する手段が選択的に設けられることができる。

フライマリー反応混合物の捕獲された生成物は2次反応の進行前に洗浄される

のが好ましい。

2次反応のための試薬溶液は入口部185を介して装置170に直接分配される。過量の2次試薬は出口部186又は187を介して流通システムから取り除かれる。他方、2次反応のための試薬は管路の前には保持されるとともに、装置170、装置と共に使用される取付け基部又は装置外部の幾つかの他の燃料供給線の貯留タンクバー内で使用される。1又は複数の流通ラインは装置170内の流通通路と直列に接続されるとともに、捕獲要素に操作可能に結合され、選択的に溶液を入口部から、制御された試薬が提供されて2次反応速度を生成する上での2次貯留タンクバーに向けて解送するように設けられる。2次反応のための試薬は捕獲されたフライマリー反応生成物と共にその酵素を特定する酵素基質、2次反応速度を決定する時に結合したプライマリー反応生成物の洗浄を補助する物質を含む。

2次反応は好ましくは流通通路182で起こり、2次反応速度が捕獲したアライマリー反応生成物と反応する。2次反応生成物は光吸収特性、蛍光特性、蛍光特性に基づいて検出可能な分子又はイオン、その放射特性によって検出可能な分子又はイオン、あるいは酵素基質特性又は電荷性によって検出可能な分子又はイオン、の群から選択される物質である。2次反応の生成物は当該技術分野において公知の手順によって増幅されてその検出を高めることができる。例えば、酵素増幅反応が採用され、2次反応産物内における酵素活性基質物質から生成されたフクロオレフィンがリリースされる。

2次反応が終了した後、生成物混合物は流通通路182内、又は結果的に輸出領域183において、あるいは装置170外部の検出器において検出される。計量される。

サンプリング速度は流通通路を横断する、流通通路177及び183の好ましい断面寸法は約100µmの幅、70µmの深さである一方、サンプリング速度の流通路を横断する、流通通路179及び182の好ましい断面寸法は約400µmの幅、70µmの深さである。これらの寸法は上述のようにメソ尺度内にある。

捕獲及び分析対象物の検出の目的で、ポリクロコナル及びモノクロコナル抗体の両

方を採用した免疫学的計量 (サンプレック) 検定及び拒否的な免疫学的検定を含む種々の適合検定プロトコルが装置 170 内で実行されることができ、検出抗体の 1 つの形態は膜上に構築された後、結合半期として検出可能なフロロレである共役標識を含む、検出抗体の他の形態はアラマイナー反応生成物からリリースされた後、検出されるフロロレである共役標識を含む、検出抗体の他の形態はホスラディンシ、ペルオキシダーゼ又はアルカリ性ホスファターゼ等の共役標識半期を含む。

流注工程は装置 170 から断在的に干渉する物質を除去するに適切な場合に実行される。

通常のサンプレック検定、試薬、洗淨溶液及び類似物が結合されるとともに、種々の流注溶液及び標識薬から、好ましくは装置 170 内の十分な種類の単標標容器内に送り出され、全てのサンプレック検定及び反応生成物が廃棄のために安全に取捨される。

第 11A 図は生物学的な細胞含有の流体サンプレック運搬の検定を要行するために使用される存在を標識し、次に特定のヌクレオチド運搬の検定を要行するために使用される分析装置 191 を概念的に示す。動作 192 上にはメン膜様の流通通路 194 a ~ 194 c が機能追加され、これは性能分離チャンパー 196 a、細胞溶解チャンパー 196 b、フィルター要素 197、部分 198 a 及び 198 b を有するポリヌクレオチド増幅チャンパー、及び検出領域 199 を有する。また、メン膜様の流通システムには検出体出入口部 193 a ~ 193 d が設けられている。この検定装置は第 8A 図に付いて説明されたような取付け基部と組合せて使用されることができ。

最初に、上述の取付け基部内のバルブが口部 193 a 及び 193 d を閉じる一方、口部 193 a 及び 193 b を開くように作用する。例えば、サンプレック処理装置から送られてきた融合細胞を含むサンプレックが、ポンプ (図示せず) 等の適切な流速率によってサンプレック入口部 193 a に案内され、流通チャンパー 194 a を経て細胞チャンパー 196 a に送られる。チャンパー 196 a はサンプレック面上に固定された結合半期を含む、これはサンプレック内における所望の形式の細胞

上の分子表面に選択的に結合する。残りの細胞成分は口部 193 b を介して基体を出る。チャンパー 196 a 内で所望の形式の細胞と結合した後、洗淨し及び目標細胞の分離を確保するために、流れがバルブを伴って継続される。次に、口部 193 b が開かれ、口部 193 c が閉じられる。流れは次に固定された細胞をチャンパー 196 a から取り除くために十分に増加される。流れは継続されて細胞をチャンパー 196 b 内の装置 195 を通過する順を通過させて細胞を間接的に細胞内物質をリリースさせる。サンプレックの流れはフィルター 197 を通過するまで継続されて大きな細胞膜及び破片が除去され、細胞物質は流通チャンパー 194 b によって PCR チャンパー部分 198 b に送られるメン膜様のチャンパー部分 198 a に送られる。PCR 検定に必要な細胞ポリメラーゼ、プライマー及び他の試薬は次にその供給源 (図示せず) から口部 193 c を介して部分 198 b に加えられ、分離された細胞試薬集団からの細胞内溶解性成分と PCR 試薬との混合を許可する。(反応混合物質が蒸発しないことを確保し、装置からの増長を防止すべく) 口部が閉じられると、ポンプ (図示せず) 等の推進機構が口部 193 b に駆動力を加え、PCR チャンパー及び試薬を各々 94°C と 65°C に設定された口部 198 a と口部 198 b との間の流通チャンパー 194 b に循環させ、複雑のポリヌクレオチドの溶解及び重畳のサイクルを実行し、試料のポリヌクレオチドの増幅を許可する。次の処理工程の前に、口部 193 c が閉じられ、口部 193 d が開かれる。同一の推進力が次に細胞集団から分離された増幅されたポリヌクレオチドを、第 9C 図について説明したような流通チャンパーのバタールの形態をなす検出領域 199 に案内するために使用される。制限された領域での減少された流れは増幅されたポリヌクレオチドの生成物の存在を概念的に示すのに役立つ。検出領域 199 を覆って配置されたガラスカバーを介して光学的に検出されることである。他方、増幅されたポリヌクレオチドの生成物はペーキン エルマ一試薬から市販されている "Ta q Man" (登録商標) 試薬等、上述の目的のために開発された薬剤的に市販されている試薬を用い、反応チャンパー内で直接に検出されることができる。また、増幅されたポリヌクレオチドは当該技術分野で公知の種々な方法、例えばエレクトロキミカル異化物の存在下におけるアガロースゲル

での電気泳動法を用い、該泳動の結果が使用されることもできる。

第11B図には本発明を実施する場合に有用な分析装置の他の実施形態が示されている。この装置2110は、メゾ規模ポリヌクレオチド増幅領域222Aが微細化された基体214を含む。この装置は第7図に示される取付け基部90と類似の取付け基部と組合せて使用される。この取付け基部は表裏210Aの口部216A、216B、216C、216Dに接続された流通通路が設けられている。また、この取付け基部は口部216A、216B、216C、216Dが機能的に閉鎖されることを許容するバルブを含む。1つの実施形態において、装置の流通システムは液圧的に駆動に維持され、取付け基部内、又は装置自体内のバルブは流体の流れを制御するのに利用されることができ、チャンパー222AはPCRのために必要な脱交差の温度、アニール及び重合の加熱を与えるのに適切な温度に加熱及び冷却される。反応領域の温度は第7図で説明したように制御されることができ、

第11B図に示される流通システムはここで説明される一般的な形式の、フィルター要素224を含む、分析の精度となる傾向のあるサンプル流率の最適可能な成分を除去するようになっている。

操作において、PCRに必要なポリメラーゼ酵素及び他の試薬を含むサンプルは入口部216Aを介して反応チャンパー222Aに分配される。口部が閉じられると、加熱要素が流体に脱交差に適した速度と、アニール及び重合に適した速度との間で反応チャンパーを重量変動させるために利用されるPCR反応サイクルが終了すると、口部216B及び口部216Dが開かれ、チャンパー222Aの内容物を、例えばベンゾ292に固定されたポリヌクレオチドの標子を含む検出領域222Bに送る。ポリヌクレオチドのための範囲的な検定は検出領域内のビーズの検定によって示される。

ポリヌクレオチド増幅はここではPCRを特に参照して説明されているが、本発明の装置及びシステムが他の種類のポリヌクレオチド増幅反応にも効果的に等しく利用されることができ、これは当該技術分野の当業者には理解されるであろう。かかる他の反応はポリメラーゼ連鎖反応等の熱的に駆動したものであるか

又はそれらは中温度（例えば、核酸反応に基づく増幅（NASBA））で実行されることである。さらに、かかる反応にはDNAリガーゼ、T7RNAポリメラーゼ及び/又は逆転写酵素、その他を含む、広範な種々の増幅試薬及び酵素を総用できる。さらに、ポリヌクレオチドの合成は公知の化学的手法又は物理的手法自体、又はこれらと温度変化とを組合せ半法によって達成されることができ、本発明の装置において実行されるポリヌクレオチド増幅反応は限定されるものではないが、次のものが含まれる：(1)自立式連鎖複製（3SR）及び鎖複製増幅（SAD）；(2)目標ポリヌクレオチドに照準される信号の増幅に基づく手法、例えば「分岐連鎖」DNA増幅（チェーン社、エミリビル、CA）；(3)増幅又は標子DNAに基づく手法、例えば「オンザターゲット」反応（LCR）及びQβレプリカザ増幅（QBR）；(4)転写に基づく手法、例えば修飾連鎖反応（RCR）及び線り（BA）；及び(5)種々の他の増幅手法、例えば修飾連鎖反応（RCR）及び線り（BA）；及び(6)これらの手法及びその商業上の販売の概要についてはジェネシスグループ、モントレリア、N.J.；ザ・ジェネシス・レポート・D.X. 3巻第4号、2月1994の2～7頁参照）。

本発明のサンプル前処理装置は本件出願と同時に出版された米国特許出願第08/308,199（代理人No. G1188）の主題である、メゾ規模ポリヌクレオチド増幅装置と関連して使用されることができ、最後に説明した出願の図示全体はここで参照されることにより増幅にされる。

簡単に言えば、最後に説明した特許出願のサンプル流体内の予め選択されたポリヌクレオチドの増幅のためのメゾ規模装置に関する。この装置には約0.1～1000 μmの断面寸法を少なくとも1つ有するポリヌクレオチド増幅チャンパーを含んで微細加工された基板が設けられている。また、この装置にはチャンパーにサンプルを導入するため、必要の場合にチャンパーを排空するため、選択的に装置から生成物又は廃棄物を取り除くため、反応チャンパーと流体流通間係にある少なくとも1つの口部が含まれている。反応チャンパーには予め選択されたポリヌクレオチドの増幅のために必要な試薬が設けられている。また、この装置には反応チャンパーの内容物を機能的に整え、予め選択されたポリヌクレオチ

ドを増得する手段が含まれている。反応チャンバーは熱的調整を促進するたばらに高い体積表面比によって形成されるのが好ましい。また、増幅反応チャンバーには必要に応じて反応チャンバーの壁面を構成する物質によって増幅反応が阻害されるのを抑制する阻害物が含まれている。

また、第 4 図、第 5 図、第 7 図に各々示される取付け基部 30、50、70、90 は計量された量のサンプル、試薬、バッファ及び類似物を分配し、同時に上述の分配プロトコルの実行に関連して装置にサンプル又は他の液体をタッピングよく添加することを実行するのに利用されるものである。これらの場合においてマイクロプロセッサが取付け基部に含まれる時、1 つ又は一通の分析のためのデータを集めることを助けるのに使用されることができ、分析対象物の測定は上記ではサンプル液体として全血を特に参照して説明されるが、この試料の分析対象物には例えば抗凝固剤を含む全血、希釈された全血、溶離された全血、凍結溶融を含む全血、血清、血漿、尿、精液、唾液、羊水、洗淨液、組織抽出液、細胞懸濁液、及びここで述べられる装置及びシステムを用いて分析されるのに有益な他のサンプル液体等、の他の生物学的液体を含む、最初のものから変化した試料サンプル又は試料が存在するものが含まれる。

第 12 A 図ないし第 12 D 図にはここで説明された装置の流通通路内に配置されることのできる制御加工され、制限された流通のセパレータの各種の他の実施形態が示される。第 12 A 図のセパレータは複数の仕切 255 1 の形態をなし、チャネル 255 3 の初期部分 255 2 a、255 2 b から突出し、チャネルに沿って長手方向に配列された、一連の流通通路部分 255 4 a、255 4 b を形成する。チャネル 255 0 の底面から突出する 1 又は複数の中間仕切 255 5 が、1 又は複数の仕切 255 1 の下流部分面に隣接して配置され、並列された流通通路 255 3 によって流れた流通通路内の腔室又はバッカルとして起立している。

比較例 1、流通通路 255 4 a、255 4 b を比較的速度で通過するサンプル液体は、平均仕切の間のスペース内に分配される一方、速度を減速し、かかるスペースのコーナーのデッドスペース内を移動する傾向にある。次に、サンプル液体が次の内部連続仕切のスペース内を通過すると、微粒子物質が各デッドボリユ

ーム内に全く低留される。従って、その後の内部仕切スペース内の各通路により、微粒子物質は累積的に制限され、サンプル液体は仕切を通過して下流に流れると、次第に稀化されるようになる。十分な数の仕切を一連に設けると、微粒子の濃度を指数的に減少させることが可能となり、その効率は予め設定されることができ、バックル 255 5 によってデッドボリユーム領域内でサンプル液体を案内することを補助できる。

第 12 C 図には隔壁 255 7 によって形成され、チャネル 255 0 の底面 255 6 から突出するダム形式のセパレータ構造が示されている。

第 12 C 図及び第 12 D 図に示されるセパレータ構造は微粒子の性質を利用し、重力の影響で得下させるようになっている。これは赤血球の沈降分離を行うことによつて全面の分析に特に有用である。サンプル液体が隔壁 255 7 上の表面で通過した後、腔室に凝縮する。チャネル 255 0 の底面に向けて低下した微粒子物質は、支持のより低い速度に加速し、渦流によって次に壁に衝撃を蒙る可能性があるが減少される。かかる一連の衝撃を蒙るサンプル流体の通路によつて微粒子濃度が段階的に減少され、徐々に稀化されたサンプル液体が生成されることができ、カバプレート 260 から取り下げられた 1 又は複数の薄片はサンプル液体を下方に案内するのを補助する。

次の実施例は本件発明をより詳細に説明するために提供される。これらの実施例は開示であることを意図し、発明を限定するものではない。

実施例 1

プラスチック、シリコン複合の給定装置はシリコン基板 131 を覆ってプラスチック (3M 透明シート) カバーを取付けることによつて組立てられ、第 8 A 図に概略的に示すように、流通チャネル 132 a、132 b が微細加工され、チャネルの両端には入口部 133 が微細加工されている。(0.05M ソリウム・バイカー・ギエリ、pH 9、6 用への) 抗 A 亜鉛溶媒と、遠隔への A 型血液の 1:10 希釈液とがホルダーを用い、シリンジを介してチャネル 132 a、132 b の対向端部の入口部 133 に導入された。溶液は中央チャンバー 135 で一

連に混合され、凝集が光学顕微鏡によつてプラスチックカバーを通して観察され

た。その結果が下面表に示される。

表A チャネル内構築

構築液	+
Gama Kit	1 : 20
Gama Murine Kono	1 : 20
Gama Human Dilutin	1 : 5
Imucor Affinity pure	1 : 100
Imucor Ascites	1 : 100

実施例2

ヤウスI g G溶液 (0.05Mソディウム・ハイカーボネイト、pH9.6内に50μg/mL) (SIGMA Cat. No. 15381) と、PBSバッファへのヤギ抗マウスI g G (H&L) - フルゼンゼイン・カルボキシレート・ヒーズ (ポリサニエンス社) の1 : 20希釈液が実施例1での説明のように準備された他の検定装置のチャネル132a、132bの対向端部の入口部にホルダーを用い、シリンジを介して導入された。溶液は反応/検出領域135で一緒に混合され、凝集が光学顕微鏡によってプラスチックカバーを通して観察された。

本発明の特定の実施形態が上記で説明され及び/又は図示されたが、上述の説明から当該技術分野の当業者には種々の他の実施形態が明らかである。従って、本発明は説明され及び/又は図示された特定の形態に限定されず、請求の範囲に記載の範囲内において種々の変形及び改良が可能である。

【図1】

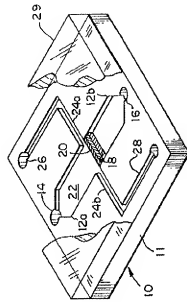
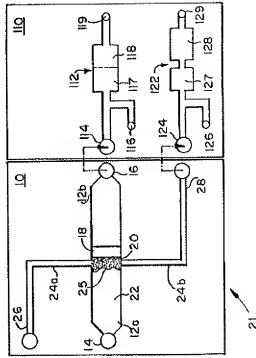


FIG. 1

【図3】

FIG. 5



[42]

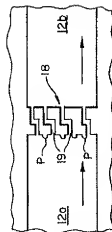


FIG. 2

[43]

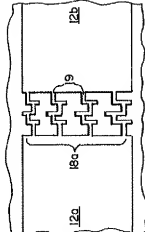


FIG. 3

[48]

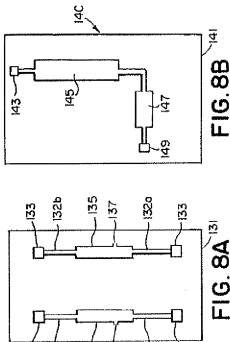


FIG. 8A

FIG. 8B

[44]

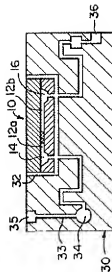


FIG. 4

[46]

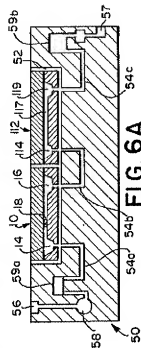


FIG. 6A

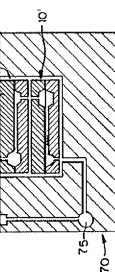


FIG. 6B

[47]

[49]

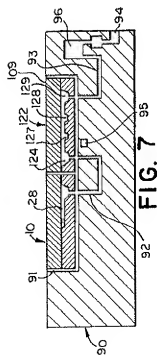


FIG. 7

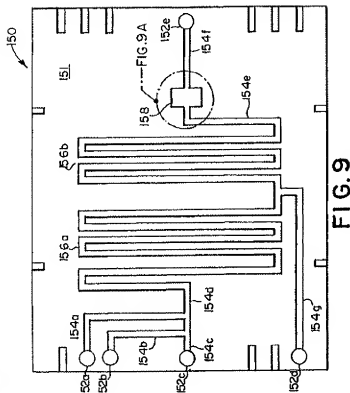


FIG. 9

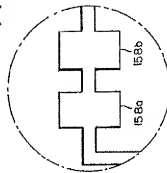


FIG. 9B

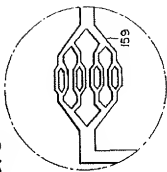


FIG. 9C

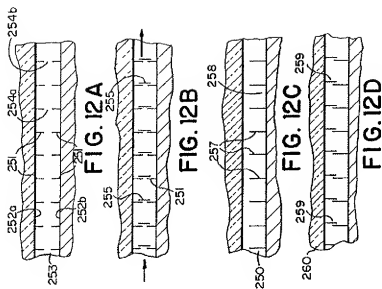
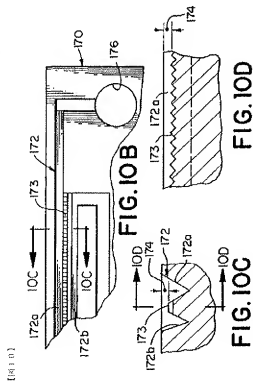


Fig. 10.2

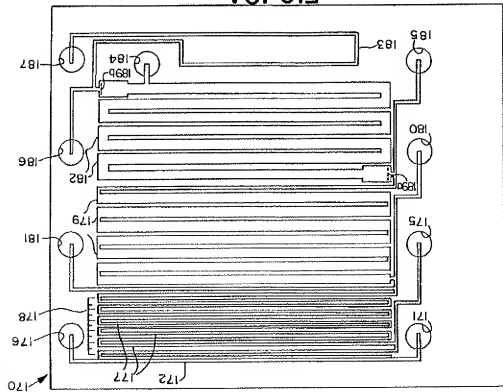


FIG. 10A

FIG. 11A

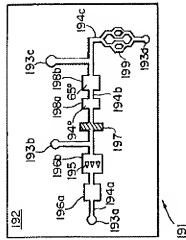
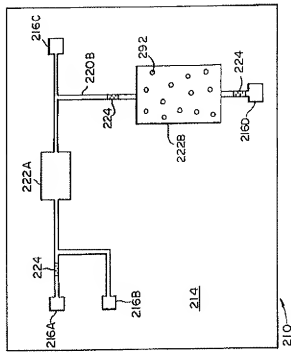


FIG. 11B



【中国医药报专刊】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

[illegible]

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Priority	Application No.
CROSS-REFERENCED DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		31	PT/US 95/1825
X	MO.A.93.22055 (TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 11 November 1993 see page 18, last paragraph - page 19, paragraph 1 *****		
Other		Refers to same No.	

ウェンハーザー錠3

G17発亮管 日本特許 08/338,728

G02発光部 1994年11月14日

(22)発亮管 米国 814 (L.S.)

(86)特許出 欧州 814 (L.S.)

DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M

C, NL, PT, SE, AU, CA, CN, JP, M

X, RU